厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
（総括）研究報告書

新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と網膜保護用デバイスの開発に関する研究

研究代表者　阿部俊明　東北大学大学院医学系研究科　教授

研究要旨：
研究計画は安全性が担保された既存薬薬剤ライブラリー等を用いた網羅的薬剤スクリーニングを行うことと、同時に低分子から蛋白質まで幅広い用途にあわせた薬剤を持続的に徐放できるデバイスの開発し網膜保護をめざすことが目標である。
今年度は既存薬ライブラリーからのスクリーニングを終了した。陽性コントロールと同等の効果を含む約200種類がスクリーニングされた。また、薬剤徐放デバイスの作製も同時に行ったが、デバイスはラット、ウサギ、サル用の作製を行い、実際にそれぞれの動物に移植した。それぞれ、デバイスのサイズのみでなく眼球曲率などに合わせた工夫が必要であった。デバイスの初期型はサルに移植した場合、一部で脱落するものが見られたが、形状を変えて移植しなおしたことで、脱落は無くなった。ラット移植用のデバイスで網膜保護効果を確認した。蛍光色素がデバイスから徐放されて網膜に達するのを確認し、さらにGGA（350Da）を徐放させた場合、網膜光障害から網膜を保護することを網膜電図、網膜組織厚で証明した。高分子の代表としてバソヒビン（42kDa）を利用したが、ラット脈絡膜新生血管を抑制した（PLoS One）。デバイスの強膜上移植で薬剤の効能に合わせた網膜保護効果が動物モデルで確認できた。本結果から我々の目指すものが、特に網膜疾患治療において創薬プロセス革新の一旦を担うことが可能であると考えられた。

A．研究目的

“比較的短期間で実現可能な既存薬や安全性が担保された薬剤ライブラリーを用いた神経保護薬剤スクリーニングとドラックデリバリーシステムを確立することを目的とする。”

視覚障害は高齢者に多く、超高齢化社会を迎えた日本では喫緊の課題であり早期に実現可能な治療法開発が必要とされる。また、視覚障害の上位はすべて網膜疾患であるために網膜保護に着目した。新規薬剤は①他疾患のために開発されたが全身投与が困難などで臨床応用されなかった薬剤や既存薬の薬剤ライブラリー、②既存の点眼薬で直接眼内投与により神経網膜保護効果が証明された薬剤で、点眼では十分な有効濃度を保持できないもの、③我々が各病態解析から有効性がみられた薬剤や東北大学に特許を有する薬剤のライブラリー（東北大学・宮田ら）を再スクリーニングする（23-24年度）。さらに本デバイスを動物モデルの眼球表面（眼内操作はしない）からで持続的に薬剤を投与する。全身の副作用を最低限に抑えながら局所で薬剤の効果と血液網膜バリアーの検討をする。

既存の薬剤など早期に臨床応用実現可能なスクリーニングと具体的な投与方法の開発を同時に行うことは極めて特徴的で独創的だと言える。早期POC取得に有利であると考えられる。また本研究での神経保護薬の発見やデバイスの開発は、これまでに治療法のない疾患に広く適応できる可能性があり、点眼のできない高齢者や複数の薬剤が必要な疾患にも有用である。

失明疾患上位の網膜色素変性などは過去に全く治療法が報告されていないが、本デバイス使用で、持続的な網膜への薬剤徐放が可能になれば新しい治療法開発になりえる。さらに上記したが、難治性網膜疾患以外でも眼疾患は高齢者に多く、超高齢化社会を迎えた日本においては、今後ますます医療経済を圧迫する大きい問題点になる可能性がある。新規デバイスで効果を示せれば、本デバイスは新規の眼疾患治療デバイスとしてそのまま利用でき社会的・経済的メリットを生む。

新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と
網膜保護用デバイスの開発に関する研究

研究代表者　阿部俊明　東北大学大学院医学系研究科　教授

すなわちUnmet Medical Needsにこたえられるのではないかと考える。高齢者は点眼を忘れたり、自分で点眼できない、複数の薬剤点眼による副作用などが改善される可能性がある。過去に報告のない本システムの開発は広く様々な疾患へ応用可能な手技となり、開発が進めば有用なデバイスになる。

B．研究方法

1）研究体制

我々はまず東北大学臨床研究推進センター内の薬事や臨床開発の専門家によるチームを結成した。臨床研究推進センターには治験コーディネーター、CRC等も配置されており、将来の臨床応用に備えた体制を整えた。

2）候補薬剤スクリーニング（23 年度からの継続）

スクリーニング予定の薬剤は以下の3種類の方法で検討される。①すでに臨床薬として承認されている既存薬ライブラリー（1274種：連携研究者の**慶應**義塾大学、**佐谷**秀行教授より提供を受ける）、および米国でヒト安全性は確立されたが最終的に製薬にならなかった薬剤ライブラリー（1040種）を用いて、網膜神経細胞の初代培養を利用して、低栄養・虚血負荷に対する保護効果スクリーニングを行う（新規薬剤）。②東北大学に特許を有し、すでにアカデミア単独で前臨床治験段階に至っているプロリル水酸化酵素阻害薬(TM6008,TM6089)、終末糖化産物AGE阻害剤（R-147176)、PAI-1阻害薬(TM-5275)、また我々がこれまでの研究成果として、動物実験レベルで網膜神経保護効果を認めたバソヒビン、HSP誘導剤、抗活性酸素薬、カルシウムチャンネル阻害薬、カルパイン阻害剤、神経栄養因子を候補薬剤としてその効果を調べる。さらに、共同研究者の植田教授が個体網膜虚血モデルで活性を見出している海洋微生物ライブラリー由来産物、全身投与によっても効果を有する内在性保護因子Prothymosin αとその部分活性ペプチド群についても検証する。ペプチド性薬剤については、最適な設計と誘導化についても検証する（候補薬剤200種）。③眼疾患で点眼に利用されている抗緑内障薬、ステロイド、新生血管抑制因子でその低い移行性のために解析が困難であった薬剤（各企業から譲渡されるか購入予定）を対象にする（既存薬剤）。担当：中澤、植田

3）デバイスの作製（24 年度）

TEGDM（Mw283）でデバイス外側を作成する。薬剤はPEG/TEG比を調整してペレット化し徐放膜で蓋をする。TEGDM 100%の膜は全く薬物を透過せず、逆に PEGDM 100%の膜は透過性が高いため PEGDM と TEGDM の組成比により透過性を制御する膜を作成する。担当：西澤、阿部、永井

4）薬効検討システム（24 年度分）

（１）ラット網膜変性モデルで検討する。網膜変性モデルは光障害モデル、遺伝性網膜変性モデルを利用する。遺伝性網膜変性は、視細胞に異常遺伝子が発現するモデルと網膜色素上皮細胞に異常遺伝子が存在するモデルを使用予定。候補になる薬剤はすべて強膜上にデバイスを固定して血液網膜バリアー通過の検討をし、構造最適化も検討する（連携研究者の東北大学・宮田敏男教授の化合物デザインチームと共同研究)。23-25 年度で行う。眼内組織への薬物移行性の評価はラベルできる分子は蛍光色素で標識し組織学的に、直接蛍光色素を測定して評価する。ラベルできない分子については液体クロマトグラフィーや ELISA などで定量を行う。

（２）ウサギ遺伝子改変網膜変性モデルの利用。１薬剤づつデバイスに入れて効果を見るのではなく、複数の薬剤（1-2 個のデバイスで 3-6 薬剤）をそれぞれ別々に徐放させ、網膜変性ウサギへの効果をまとめて確認し、さらに複数薬剤投与の効果も確認

新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と
網膜保護用デバイスの開発に関する研究

研究代表者　阿部俊明　東北大学大学院医学系研究科　教授

する。対眼はコントロールに利用する。3種類の薬剤を使用するときは組み合わせはスクリーニングされる薬剤のすべてをうまく網羅できるように工夫する。同じ薬剤が複数回組み合わさるように工夫して、候補薬を絞り込む。短期間（3-6カ月以内）で効果がみられないものは除外していく。

（３）網膜保護効果の測定
経時的に網膜電図、眼底検査、蛍光眼底撮影、瞳孔反応、さらに行動検査を行うが、必要に応じてより詳細な組織学的検査、アポトーシス検査、各種遺伝子発現検査を行う。

（４）保護作用の機序解明
網膜保護効果が見られたものは、薬剤の本来の機序を基本に経時的な網膜の解析を行い保護効果の機序を解明し、さらに新しい薬剤の開発の可能性を探る（25年度）。

（倫理面への配慮）
　動物実験に関しては、研究機関内の承認手続きを経てから国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定、ならびに動物の愛護及び管理に関する法律を遵守して厳格に動物実験を行う。今回の動物実験計画の一部は東北大学動物実験施設に計画書を提出し、東北大学総長より実験遂行の許可をうけていること、また申請者はこれまでにサル、ウサギ、マウス、ラットの実験に長年従事しており、自然科学研究機構生理学研究所から研究用ニホンザルの供給を受けたことなど、動物を扱う倫理面には問題ない。東北大学動物実験規定は毎年結果報告と再申請が義務付けられており、動物の扱いは厳格に監視されている。

C．研究結果（24年度）

(1)薬剤ライブラリーのスクリーニング

既存薬ライブラリー（2314種）からのスクリーニングが終了した。
まず人網膜色素上皮細胞株（ARPE）を用いて低栄養・虚血負荷（血清、グルコース非含有培地、2% 酸素下）に各種薬剤を10 μM で投与し 24 時間後に AlamarBlue を用いて細胞増殖アッセイを行って保護薬のスクリーニングを終了した。低栄養・虚血負荷によって細胞内では小胞体ストレスが誘導されていると推測されるため、小胞体ストレスに有効とされているゲラニルゲラニルアセトン（GGA）を比較対象として用いた。また、血清、グルコース含有培地を用いて 20% 酸素下でインキュベートしたものをポジティブコントロールとした。その結果 285 種で GGA と同等かより効果が見られた。さらにポジティブコントロールと同等の効果が見られるヒット化合物を見出した（23 年度の報告書で 2 つと記載したが、実際は同一の化合物であった)。本化合物は網膜神経節細胞を利用した負荷培養でも濃度依存的に効果を示した。

(2) スクリーニングされた化合物とデバイスを用いた神経保護薬の探索

上記で保護効果の見られた薬剤を順次デバイスに包埋し網膜保護効果を確認することを目指した。まず薬剤徐放に先立って蛍光色素の網膜内への徐放を確認したが、移植 1 日で最低でも網膜色素上皮に達し、3 日では神経網膜内に広がるのが確認された。

新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と
網膜保護用デバイスの開発に関する研究

研究代表者　阿部俊明　東北大学大学院医学系研究科　教授

① 低分子徐放による網膜保護効果の検討

デバイスからの徐放が網膜保護効果を示すか、まず低分子の代表として GGA を用いて、網膜光障害に対する効果につて検討した。これは既報で GGA の硝子体内投与が光障害から網膜を保護することが報告されているために、本デバイスの効果を確認できると考えて行われた。その結果、網膜電図では GGA 徐放デバイス移植群で有意に網膜保護効果が確認された。さらに眼球摘出後、網膜外顆粒層（ONL）の厚さを視神経乳頭から網膜鋸状縁まで計測したが､デバイス移植側で有意に ONL の厚さが保たれることも確認した。徐放される GGA の量も徐放膜は PEG60%が最適であることが判明した。

②高分子徐放による網膜保護効果の検討

高分子の代表としてバソヒビン（40ｋDa）を徐放するデバイスを作製した。バソヒビンは上記負荷モデルで網膜色素上皮の保護効果があることが判明したが、まず本来ある新生血管抑制効果を確認するためにデバイスから徐放されるバソヒビンの新生血管抑制作用を ***in vitro*** で確認し、***in vivo*** ではラットに新生血管モデル（CNV）を作製して検討した。デバイスから徐放されたバソヒビンは、培地中に直接投与のバソヒビンと同様の新生血管抑制作用が確認できた。さらにバソヒビン徐放デバイス強膜上移植群では有意に CNV 抑制効果があることが判明した。Flat mount を作製した標本の検討ではバソヒビン徐放量の多いデバイス移植でより効果が見られた。

D．考察

本研究では、安全性が担保されている薬剤ライブラリーから網膜細胞に保護効果のある薬剤をスクリーニングして、強膜上から徐放することで網膜保護効果を確認した。本方法は近年特に注目を集めているdrug reprogramming strategy（DR）の１つになると考えられるが、今回の検討で注目されるのは、DRをさらに有効にする手段として局所で安全に薬剤徐放デバイスを機能させたことにある。創薬は化合物のスクリーニングのあとに構造最適化などの複雑なプロセスが含まれるが、我々が開発した強膜上薬剤徐放デバイスはこれまで検討した薬剤を十分に網膜に徐放していると考えられる。本研究は創薬プロセスの革新に眼科領域から取り組むことに成功していると言え、これからの行政施策にも貢献できると考える。

E．結論

網膜細胞保護に役立つ薬剤がスクリーニングされた。我々のデバイスから徐放された薬剤は網膜まで徐放されているのが確認され、徐放薬剤の網膜保護効果も確認された。眼内注射に代わる眼内への安全な薬物投与方法として期待できる。

F．健康危険情報

該当なし

新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と
網膜保護用デバイスの開発に関する研究

研究代表者　阿部俊明　東北大学大学院医学系研究科　教授

G. 研究発表

1. 論文発表

１． Abe T, Tokita-Ishikawa Y, Onami H, Katsukura Y, Kaji H, Nishizawa M, Nagai N. Intra-scleral transplantation of collagen sheet with cultured brain-derived neurotrophic factor expressing cells partially rescued the retina from the damage of acute high intraocular pressure. **Adv Exp Med Biol** ;in press.

２． Onami H, Nagai N, Kaji H, Nishizawa M, Sato Y, Osumi N, Nakazawa T, Abe T.Transscleral sustained vasohibin-1 delivery by a novel device suppressed experimentally-induced choroidal neovascularization. PLoS One. 2013;8(3):e58580

３． Metabolic stress response implicated in diabetic retinopathy: the role of calpain, and the therapeutic impact of calpain inhibitor.　Ahmed Y Shanab, Toru Nakazawa, Morin Ryu, Yuji Tanaka, Noriko Himori, Keiko Taguchi, Masayuki Yasuda, Ryo Watanabe, Jiro Takano; Saido Takaomi, Naoko Minegishi; Toshio Miyata, Toshiaki Abe, Masayuki, Yamamoto,　Neurobiol Dis. 2012 Dec;48(3):556-67.

４． Intraocular Concentrations of Cytokines and Chemokines in Rhegmatogenous Retinal Detachment and the Effect of Intravitreal Triamcinolone Acetonide” Hiroshi Kunikata, Masayuki Yasuda,　Naoko Aizawa, Yuji Tanaka, Toshiaki Abe, and Toru Nakazawa. AJO,2013 Jun;155(6):1028-1037.

５． Efficacy of combined 25-gauge microincision vitrectomy, intraocular lens implantation, and posterior capsulotomy.　Aizawa N, Kunikata H, Abe T, Nakazawa T.　J Cataract Refract Surg. 2012 Sep;38(9):1602-7.

６． Choroidal excavation with polypoidal choroidal vasculopathy: a case report.　Kobayashi W, Abe T, Tamai H, Nakazawa T.　Clin Ophthalmol. 2012;6:1373-6. Epub 2012 Aug 27.

７． Hideyuki Onami, Nobuhiro Nagai, Shigeki Machida, Norihiro Kumasaka, Ryosuke Wakusawa, Yumi Ishikawa, Hikaru Sonoda, Yasufumi Sato, Toshiaki Abe. “Reduction of laser-induced choroidal neovascularization by intravitreal vasohibin-1 in monkey eyes” Retina. 2012 Jun;32(6):1204-13

８． Yumi Tokita-Ishikawa, Nobuhiro Nagai, Hideyuki Onami, Norihiro Kumasaka, Hikaru Sonoda, Tomoaki Takakura, Yasufumi Sato, Toshiaki Abe. “Vasohibin and retinal pigment epithelium” **Adv Exp Med Biol,** 723, 305-310 (2012)

９． 浅野俊一郎、阿部俊明、國方彦志、今留尚人、高橋麻衣、中澤徹：右眼に急性網膜壊死を発症した16年後に左眼にも発症した1例.

１０． 雪田昌克、國方彦志、小林航、小林直樹、阿部俊明、中澤徹：角膜染血を伴う硝子体出血に広角観察システム併用25G手術が奏功した一例. 臨床眼科. 2013. 印刷中

１１． 相澤奈帆子、國方彦志、岡村知世子、阿部俊明、中澤徹：25G硝子体手術中の脈絡膜剥離. 眼科臨床紀要5(8)：792-796，2012.8.

１２． 金澤紘子、國方彦志、安田正幸、新田文彦、鬼怒川次郎、阿部俊明、中澤徹：特発性黄斑円孔に対する硝子体手術成績とトリアムシノロンアセトニドの効果. 臨床眼科66(8)：1219-1224，2012.8.

１３． 黄斑円孔術後に発症した脈絡膜新生血管の一例　伊藤梓、國方彦志、阿部俊明、安田正幸、中澤徹　眼科臨床紀要2012:5(9)855-859.

新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と
網膜保護用デバイスの開発に関する研究

研究代表者　阿部俊明　東北大学大学院医学系研究科　教授

2. 学会発表
（国際学会発表）

1. Hirokazu Kaji, Nobuhiro Nagai, Takuya Yamada, Matsuhiko Nishizawa, Toshiaki Abe. An Implantable Drug Delivery Device for Treating Retinal Disorders. 2012 IEEE-EMBS Micro and Nanotechnology in Medicine Conference
2. Toshiaki Abe, Yumi Tokita-Ishikawa, Hideyuki Onami, Yuki Katsukura, Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, Nobuhiro Nagai.：Intra-scleral transplanation of collagen sheet with cultured brain-derived neurotrophic factor expressing cells partially rescued the retina from the damage of acute high intraocular pressure. XVth International Symposium on Retinal Degeneration. July 16-21, 2012. Bad Gögging, Bavaria, Germany
3. Nobuhiro Nagai, Hideyuki Onami, Hirokazu Kaji, Takuya Yamada, Yuki Katsukura, Machiko Sato, Yumi Ishikawa, Toru Nakazawa, Matsuhiko Nishizawa, and Toshiaki Abe. Protective Effects of Transscleral Drug Delivery Device Against Light-induced Retinal Damage in Rats. 2012 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida.
4. Hideyuki Onami,Nobuhiro Nagai, Toshiaki Abe. Suppression of Rat Choroidal Neovascularization by Transscleral Vasohibin-1 Delivery Device. 2012 ARVO annual meeting, Fort Lauderdale, Florida.

（国内学会発表）

１．　相澤奈帆子、國方彦志、新田文彦、阿部俊明、中澤徹　トロピカミド・フェニレフリン塩酸塩点眼による眼底血流への影響　日本網膜硝子体学会　2012/11/30
２．高橋秀肇、阿部俊明、國方彦志、中澤徹　ぶどう膜炎を合併したＭＰＰＥから増殖性硝子体網膜症に至った1例　日本網膜硝子体学会　2012/11/30
３．前川重人、阿部俊明、國方彦志、中澤徹　急性網膜壊死52眼に対する硝子体硝子体手術後成績　日本網膜硝子体学会　2012/11/30
４．新田文彦、國方彦志、阿部俊明、中澤徹　ペガプタニブ硝子体投与の眼循環血流に与える影響　日本網膜硝子体学会　2012/11/30
５．萱場寛子、阿部俊明、國方彦志、新田文彦、中澤徹　無光覚に陥った加齢黄斑変性の背景に関する検討　日本網膜硝子体学会　2012/11/30
６．新田文彦、國方彦志、阿部俊明、中澤徹　糖尿病黄斑浮腫におけるトリアムシノロン後部テノン嚢下注射前後の眼血流変化の検討　日本臨床眼科学会　2012/10/25
７．相澤奈帆子、國方彦志、目黒泰彦、阿部俊明、中澤徹　２５Ｇ小切開硝子体手術での後嚢切開併施トーリック眼内レンズ挿入術の有用性　日本臨床眼科学会　2012/10/25
８．　國方彦志、相澤奈帆子、布施昇男、阿部俊明、中澤徹　線維柱帯切除後眼に対する２５Ｇ硝子体手術　日本臨床眼科学会　2012/10/25
９．　１２．雪田昌克、國方彦志、小林航、阿部俊明、中澤徹　強い角膜血染混濁を伴う硝子体出血に広角観察系25Ｇ手術が奏功した一例　日本臨床眼科学会　2012/10/25
１０．浅野俊一郎、今留尚人、大友孝昭、阿部俊明、中澤徹　右眼にＡＲＮを発

新規薬剤の生体内スクリーニングシステムの確立と
網膜保護用デバイスの開発に関する研究

研究代表者　阿部俊明　東北大学大学院医学系研究科　教授

症した16年後に左眼にも発症した1例　日本臨床眼科学会　2012/10/25

１１．阿部俊明：加齢と眼〜眼の病気を知りましょう〜　市民公開講座ＮＴＴ病院　2012/7/25

１２．大浪英之、永井展裕、梶弘和、山田琢也、勝倉由樹、西澤松彦、中澤徹、阿部俊明　プロテインドラッグ眼内徐放デバイスによる加齢黄斑変性治療の試み　日本DDS学会　2012/7/4-5

１３．永井展裕、大浪英之、梶弘和、山田琢也、勝倉由樹、小柳恵理、中澤徹、西澤松彦、阿部俊明　網膜光障害モデルに対する経強膜DDSの網膜保護効果　日本DDS学会　2012/7/4-5

１４．大浪英之、永井展裕、梶弘和、西澤松彦、佐藤靖史、中澤徹、阿部俊明　分子徐放デバイスと神経保護　東北臨床超微形懇話会

１５．阿部俊明：加齢黄斑変性の予防と治療　元気健康フェア　2012/4/29

１６．大浪英之、永井展裕、梶弘和、西澤松彦、涌澤亮介、佐藤靖史、中澤徹、阿部俊明：経強膜 vasohibin 徐放デバイスによるラット脈絡膜新生血管抑制　第116回日本眼科学会総会　2012/4/5-8

１７．新田文彦、國方彦志、永富良一、牛凱軍、玉井洋、相澤奈帆子、志賀由己浩、阿部俊明、中澤徹　健常人でのレーザースペックル（無散瞳タイプ）の眼循環血流の波形解析と年齢の検討第 116 回日本眼科学会総会 2012/4/5-8

H．知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3.その他
なし